人一氧化碳血红蛋白（HbCO）酶联免疫分析试剂盒使用说明书

本试剂盒仅供体外研究使用

预期应用

ELISA 法定量测定人血清、血浆、细胞培养上清或其它相关生物液体中 HbCO 含量。

实验原理

用纯化的抗体包被微孔板，制成固相载体，往包被抗 HbCO 抗体的微孔中依次加入标本或标准品、生物素化的抗 HbCO 抗体、HRP 标记的亲和素，经过彻底洗涤后用底物 TMB 显色。TMB 在过氧化物酶的催化下转化成蓝色，并在酸的作用下转化成最终的黄色。颜色的深浅和样品中的 HbCO 呈正相关。用酶标仪在 450nm 波长下测定吸光度（OD 值），计算样品浓度。

试剂盒组成及试剂配制

1. 酶联板：一块（96 孔）

2. 标准品（冻干品）：2 瓶，每瓶临用前以样品稀释液稀释至 1ml，盖好后静置 10 分钟以上，然后反复颠倒/搓动以助溶解，其浓度为 200 pg/ml，做系列倍比稀释后，分别稀释

200 pg/ml，100 pg/ml，50 pg/ml，25 pg/ml，12.5 pg/ml，6.25 pg/ml，3.12 pg/ml，样品稀释液直接作为标准浓度 0 ng/ml，临用前 15 分钟内配制。

如配制 100 pg/ml 标准品：取 0.5ml（不要少于 0.5ml）200 pg/ml 的上述标准品加入含有 0.5ml 样品稀释液的 Eppendorf 管中，混匀即可，其余浓度以此类推。

3. 样品稀释液：1×20ml/瓶。

4. 检测稀释液 A：1×10ml/瓶。

5. 检测稀释液 B：1×10ml/瓶。

6. 检测溶液 A：1×120ul/瓶（1:100）临用前以检测稀释液 A 1:100 稀释，稀释前根据预先计算好的每次实验所需的总量配制（每孔 100ul），实际配制时应多配制 0.1-0.2ml。如 10ul 检测溶液 A 加 990ul 检测稀释液 A 的比例配制，轻轻混匀，在使用前一小时内配制。

7. 检测溶液 B：1×120ul/瓶（1:100）临用前以检测稀释液 B 1:100 稀释。稀释方法同检测溶液 A。

8. 底物溶液：1×10ml/瓶。

9. 浓洗涤液：1×30ml/瓶，使用时每瓶用蒸馏水稀释 25 倍。

10. 终止液：1×10ml/瓶（2N H_2SO_4）。

标本的采集及保存

1. 血清：全血标本请于室温放置 2 小时或 4℃过夜后于 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

2. 血浆：可用 EDTA 或肝素作为抗凝剂，标本采集后 30 分钟内于 2 - 8° C 1000 x g 离心 15 分钟，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

3. 细胞培养物上清或其它生物标本：请 1000 x g 离心 20 分钟，取上清即可检测，或将标本放于-20℃或-80℃保存，但应避免反复冻融。

注：以上标本置 4℃保存应小于 1 周，-20℃或-80℃均应密封保存，-20℃不应超过 3 个月，-80℃不应超过6个月；标本溶血会影响最后检测结果，因此溶血标本不宜进行此项检测；高血脂的标本不需进行特殊处理，可直接检测。

操作步骤

实验开始前，请提前配制好所有试剂；试剂或样品稀释时，均需混匀，混匀时尽量避免起泡。每次检测都应该做标准曲线。如样品浓度过高时，均应用样品稀释液进行稀释，以使样品符合试剂盒的检测范围。建议各实验室在操作前先进行预实验以建立最佳稀释倍数。

1. 加样：分别设空白孔、标准孔、待测样品孔。空白孔加样品稀释液 100ul，余孔分别加标准品或待测样品 100ul，注意不要有气泡，加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀，酶标板加上盖或覆膜，37℃反应 120 分钟。

为保证实验结果有效性，每次实验请使用新的标准品溶液。

2. 弃去液体，甩干，不用洗涤。每孔加检测溶液 A 工作液 100ul（在使用前一小时内配制），37℃,60 分钟 。

3. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 3 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干（也可轻拍将

孔内液体拍干）。

4. 每孔加检测溶液 B 工作液（同检测 A 工作液） 100ul，37℃，60 分钟。

5. 温育 60 分钟后，弃去孔内液体，甩干，洗板 5 次，每次浸泡 1-2 分钟，350ul/每孔，甩干（也可轻拍将孔内液体拍干）。

6. 依序每孔加底物溶液 90ul，37℃避光显色（30 分钟内，此时肉眼可见标准品的前 3-4 孔有明显的梯度兰色，后 3-4 孔梯度不明显，即可终止）。

7. 依序每孔加终止溶液 50ul，终止反应，此时蓝色立转黄色。终止液的加入顺序应尽量与底物液的加入顺序相同。为了保证实验结果的准确性，底物反应时间到后应尽快加入终止液。

8. 用酶联仪在 450nm 波长依序测量各孔的光密度（OD 值）。 在加终止液后立即进行检测。

注：

1. 每次实验留一孔作为空白调零孔（不同于空白孔），该孔不加任何试剂，只是最后加底物溶液及2N H_2SO_4。测量时先用此孔调 OD 值至零。

2. 严格按照规定的时间和温度进行温育以保证准确结果。所有试剂都必须在使用前达到室 温。使用后立即冷藏保存试剂。

3. 洗板不正确可以导致不准确的结果。在加入检测溶液 B 或底物前确保尽量吸干孔内液体。为防止样品蒸发，试验时将反应板放于铺有湿布的密闭盒内，酶标板加上盖或覆膜，以避免液体蒸发；洗板后应尽快进行下步操作，避免酶标板长时间处于干燥状态。

4. 消除板底残留的液体和手指印，否则影响 OD 值。

5. 在储存和温育时避免强光直接照射。

6. 未使用完的酶标板或者试剂，请于 2-8℃保存。标准品、检测溶液 A 工作液、检测溶液 B 工作液请依据所需的量配置使用，请精确配置标准品及工作液，尽量不要微量配置（如吸取检测溶液 A 时，一次不要小于 10ul），以避免由于不准确稀释而造成的浓度误差；检测液 A、B，以及底物溶液在使用前，应置于 37℃温育 30 分钟；请勿重复使用已稀释过的标准品、检测溶液 A 工作液或检测溶液 B 工作液。

7. 建议检测样品时均设双孔测定，以保证检测结果的准确性。

洗板方法

手工洗板方法：吸去（不可触及板壁）或甩掉酶标板内的液体；在实验台上铺垫几层吸水纸，酶标板朝下用力拍几次；将推荐的洗涤缓冲液至少 0.3ml 注入孔内，浸泡 1-2 分钟，根据需要，重复此过程数次。

自动洗板：如果有自动洗板机，应在熟练使用后再用到正式实验过程中。

特异性

本试剂盒可同时检测重组或天然的人 HbCO 且与其它相关蛋白无交叉反应。

计算

以标准物的浓度为横坐标（对数坐标），OD 值为纵坐标（普通坐标），在半对数坐标纸上绘出标准曲线（推荐使用专业制作曲线软件进行分析，如 curve expert 1.3），根据样品的 OD 值由标准曲线查出相应的浓度，再乘以稀释倍数；或用标准物的浓度与 OD 值计算出标准曲线的回归方程式，将样品的 OD 值代入方程式，计算出样品浓度，再乘以稀释倍数，即为样品的实际浓度。

注意事项

1. 洗涤过程非常重要，不充分的洗涤易造成假阳性。

2. 一次加样时间最好控制在 5 分钟内，如标本数量多，推荐使用多道移液器加样。

3. 请每次测定的同时做标准曲线，最好做复孔。

4. 如标本中待测物质含量过高，请先稀释后再测定，计算时请最后乘以稀释倍数。

5. 在配制标准品、检测溶液工作液时，请以相应的稀释液配制，不能混淆。

6. 底物请避光保存。

说明

1. 在储存及孵育过程中避免将试剂暴露在强光中。所有试剂瓶盖须盖紧以防止蒸发和污染，试剂避免受到微生物的污染，因为蛋白水解酶的干扰将导致出现错误的结果。

2. 小心吸取试剂并严格遵守给定的孵育时间和温度。请注意在吸取标本 / 标准品，酶结合物或底物时，第

一个孔与最后一个孔加样之间的时间间隔如果太大，将会导致不同的 “预孵育”时间，从而明显地影响到测量值的准确性及重复性。而且，洗涤不充分将影响试验结果。

3. 试剂盒保存：部分试剂保存于-20℃，部分试剂保存于 2-8℃，具体以标签上的标示为准。

4. 浓洗涤液会有盐析出，稀释时可在水浴中加温助溶。

5. 刚开启的酶联板孔中可能会含有少许水样物质，此为正常现象，不会对实验结果造成任何影响。

6. 中、英文说明书可能会有不一致之处，请以英文说明书为准。

7. 所有的样品都应管理好，按照规定的程序处理样品和检测装置。

8. 有效期：6 个月